

CIP - of
AHy Docket #76459

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 1994年 4月28日
Date of Application:

出願番号 平成 6年特許願第114316号
Application Number:

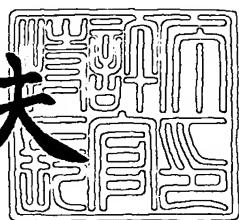
[ST. 10/C]: [JP1994-114316]

出願人 田邊忠 /
Applicant(s):

2003年 9月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3073974

【書類名】 特許願
【整理番号】 A2386
【提出日】 平成 6年 4月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/00
【発明の名称】 ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ
【請求項の数】 10
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号
【氏名】 田邊 忠
【特許出願人】
【識別番号】 000004569
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社
【代表者】 水野 繁
【代理人】
【識別番号】 100080791
【弁理士】
【氏名又は名称】 高島 一
【電話番号】 06-227-1156
【手数料の表示】
【納付方法】 予納
【予納台帳番号】 006965
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【物件名】 受託証 2

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 実質的に配列表の配列番号 12 で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含むDNA。

【請求項 2】 実質的に配列表の配列番号 11 で示される塩基番号 28 乃至 1527 の塩基配列を有するDNAを含む請求項 1 記載のDNA。

【請求項 3】 配列表の配列番号 11 で示される塩基番号 28 乃至 1527 の塩基配列を有する請求項 2 記載のDNA。

【請求項 4】 実質的に配列表の配列番号 12 で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼのアミノ酸配列を有するポリペプチド。

【請求項 5】 配列表の配列番号 12 で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼのアミノ酸配列を有する請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】 請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項 7】 請求項 6 記載の組換えベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 8】 国際寄託番号 FERM BP-4653 または FERM BP-4654 で識別される形質転換細胞。

【請求項 9】 請求項 7 記載の宿主細胞を培地中で培養して得られる培養物からヒト由来プロスタサイクリンシンターゼを取得することを特徴とするヒト由来プロスタサイクリンシンターゼの製造方法。

【請求項 10】 実質的に配列表の配列番号 12 で示されるアミノ酸配列を有するヒト由来プロスタサイクリンシンターゼに反応性を有する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、ヒト由来のプロスタサイクリンシンターゼ (Prostacyclin synthase)

e、以下、PGISという)のアミノ酸配列を有するポリペプチド、それをコードするDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞および該宿主細胞を培養することによるヒト由来PGISの製造方法に関する。更に、当該PGISまたはその断片に対して反応性を示す抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

PGISは、主として血管内皮細胞のミクロソーム画分に含まれ、プロスタグラニン I_2 （以下、PGI $_2$ という）の合成、すなわちプロスタグラニンH $_2$ （以下、PGH $_2$ という）からPGI $_2$ への変換を触媒する酵素である。

【0003】

かかる酵素によって合成されるPGI $_2$ は、強力な血小板凝集抑制作用および血管平滑筋弛緩作用を有する物質である。一方、血小板には当該PGI $_2$ とは相反する作用、すなわち強力な血小板凝集作用および血管平滑筋収縮作用を有するトロンボキサンA $_2$ （以下、TXA $_2$ という）が存在しており、血管系において両物質が拮抗的に作用し生体内の恒常性の維持に関与している〔ブリティッシュジャーナル オブ ファーマコロジー（B r . J . P h a r m a c o l . ）, 76卷, 3頁, 1982年〕。

【0004】

近年、成人病の一つとして挙げられている心筋梗塞血栓症や動脈硬化症等の循環器系の疾患は、かかるPGI $_2$ とTXA $_2$ の血管内における産生の不均衡、とりわけPGI $_2$ の産生低下に基づく血管系の機能不全によって生じるものと考えられている（同上文献）。

【0005】

このようなPGI $_2$ 産生低下が原因と考えられる疾病的治療法として、PGI $_2$ を医薬品として体外から補うことが考えられる。しかし、PGI $_2$ は化学的に極めて不安定な物質であるためPGI $_2$ 自体を医薬品として実用化することは困難である。かかる観点から、例えば現在、血液凝固阻止剤、血管拡張剤として安定なPGI $_2$ 類縁体の開発が進められている。

【0006】

しかしながら、本来 PG_{I₂} と TXA₂ との均衡のもとに成り立っている生体内の恒常性は、安定な PG_{I₂} 類縁体の投与によって却って崩れる可能性が考えられる。すなわち、安定な PG_{I₂} 類縁体を多量に投与することは、細胞の PG_{I₂} 応答性を低下させ、緊急の場合に PG_{I₂} に反応できなくなるという危険性を含む [プロスタグランジンズ、19巻、2頁、1980年]。

【0007】

従って、血栓症等の治療効果を期待すべく PG_{I₂} と TXA₂ との不均衡を是正して血管系の正常機能の回復を図るためにには、化学的に安定な類縁体を用いる一方で、PGIS の物理化学的性状及び生物学的性状を解明し、当該 PGIS あるいは PGIS をコードする DNA を研究試薬として用いて PGIS と PG_{I₂} 產生の関わりを明らかにすること、および該 PGIS あるいはそれをコードする DNA を医薬品として開発し、PG_{I₂} の產生を制御することが前述のような PG_{I₂} と TXA₂ との不均衡に起因する各種疾患の治療に対して重要かつ有意義なことと考えられる。

【0008】

従来、PGIS に関しては、組織分布、即ち各種組織の血管内皮細胞、非血管平滑筋細胞、及び動脈平滑筋における存在が報告されている [Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research, Vol.11, pp.87-92, (1983), 及び J. Biol. Chem., Vol.258, No.9, pp.5922-5926, (1983)]。また、ブタ及びウシから PGIS の単離精製が試みられ [ブタ: Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications, pp.103-106 (1982) 、ウシ: J. Biol. Chem., Vol.258, No.9, pp.3285-3293 (1983)]、ウシ PGIS の N 末端アミノ酸配列および下流の部分アミノ酸配列が報告されている [Advances in Prostaglandin, Thromboxane, and Leukotriene Research, Vol.17, pp.29-33 (1987) 、 Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.197, No.3, pp.1041-1048 (1993) 等]。

【0009】

しかしながら、ヒトの PGIS については、その単離、精製およびアミノ酸配列について、今だ解明されていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ヒト由来PGISのアミノ酸配列を明らかにし、当該ヒト由来PGIS及び該PGISをコードするDNAを提供することである。

【0011】

該PGIS及びこれをコードするDNAは、①PGISの分子あるいは遺伝子レベルでの物理化学的性状、及び生物学的性状の解析、②PGISの產生調節メカニズム、PGISに係るPGI₂の產生調節メカニズムの解析、及び③PGI₂とTXA₂との產生量不均衡に起因すると考えられる各種循環器系疾患の原因究明および該疾患に対する治療薬の開発のための分子あるいは遺伝子レベルでの解析のための試薬として有用である。また、PGISあるいはそのmRNAに体内組織発現レベルおよび分布を測定するための診断薬として有用である。さらには、それら自身、それらの断片、あるいはそれらの修飾体を疾患部位特異的に生体内に導入することにより、PGI₂の產生レベルを高めることによる、例えば血栓症、心筋梗塞、動脈硬化、狭心症等の各種循環器系疾患に対する治療薬としての利用が期待される。

【0012】

さらに、本発明の目的は、ヒト由来PGISをコードするDNAを含有する組換えベクター、および該ベクターで形質転換された宿主細胞からなるPGISの発現系を提供することであり、さらに該発現系を用いてPGISを遺伝子工学的に製造する方法を提供することである。

【0013】

かかる方法により、ヒト由来PGISの簡便かつ効率的な量産が可能となる。

【0014】

また、本発明はヒト由来PGISの精製、免疫組織化学的、病因解析に有用なヒト由来PGIS抗体を提供することを目的とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上述の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒト動脈血管

内皮細胞からPGISをコードするcDNAのクローン化に成功し、そのcDNAの塩基配列からヒト由来PGISの一次構造を決定して本発明を完成するに至った。

【0016】

すなわち本発明は、実質的に配列番号12で示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含むDNA、好ましくは実質的に配列番号11に示される塩基番号28乃至1527の塩基配列を有するDNAを含むDNA、より好ましくは配列番号11に示される塩基番号28乃至1527の塩基配列を有するDNAに関する。

【0017】

また本発明は、上記DNAを含有する組換えベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培地中で培養して得られる培養物からヒト由来PGISを取得することを特徴とするヒト由来PGISの製造方法に関する。

【0018】

さらに本発明は、実質的に配列番号12で示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列を有するポリペプチド、また当該ヒト由来PGISに反応性を示す抗体に関する。

【0019】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のポリペプチドは、PGH₂をPGI₂に変換する触媒活性を有し、実質的に後記配列表の配列番号12に示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0020】

ここで「実質的に」とは、本発明のポリペプチドは、配列番号12に示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドに限定されず、当該アミノ酸配列を有するヒト由来PGISと同様な免疫学的かつ生物学的活性（ヒトPGIS活性）を有する限り、配列番号12で示されるアミノ酸配列中のアミノ酸の幾つかについて欠失、置換もしくは付加等あってもよいという趣旨である。

【0021】

アミノ酸の欠失、置換もしくは付加部位は特に制限されないが、少なくとも配列番号12に示されるアミノ酸配列中の441位のCys残基周辺領域は保存されている必要がある。というのも、本発明のヒト由来PGISは、そのアミノ酸配列において既知のチトクロームP450とホモロジーを有し、かつC末端側のアミノ酸配列中にチトクロームP450の生物活性発現に重要なヘム結合部位（第5配位子）に相当するCys残基を有することから、チトクロームP450ファミリーに属する新規タンパクであると推定されるからである（生物物理、Vol. 32, No.1, pp.10-15, 1992年参照）。

【0022】

本発明のポリペプチドは、好ましくは配列番号12に示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。

【0023】

本発明のポリペプチドが有するPGIS活性とは、PGH₂をPGI₂に変換する触媒活性をいう。当該PGIS活性は、例えばSalmon, J. A.およびFlower, R. J.らの方法 [Methods Enzymol. 86, pp.p91-99 (1982)]に従って、¹⁴Cラベル化PGH₂のPGI₂への変換を、代謝産物である6-ケト-PGF_{1α}を薄層クロマトグラフィーにて分離したのち、該6-ケト-PGF_{1α}の放射活性を検出することによって測定される。

【0024】

また、本発明は、実質的に配列番号12で示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含むDNAに関する。

【0025】

当該DNAは、上述のヒト由来PGISのアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNAを含むものであればいかなるものでもよく、具体的には、配列番号12で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたはそれと同等の免疫学的および生物学的活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。より具体的には、配列番号11で示される塩基配列中、塩基番号28乃至1527で示される塩基配列を含有するDNAを挙げることができる。

【0026】

一般に、遺伝子組換え技術分野では、遺伝暗号の縮重に従い、遺伝子から產生される蛋白質のアミノ酸配列を変えることなくその遺伝子のDNA配列の少なくとも一つの塩基を他の塩基に置換することができる。従って、本発明のDNAは、配列表配列番号11の塩基番号28乃至1527で示される塩基配列を遺伝暗号に基づく置換によって変化された塩基配列を有するDNAをも包含する。

【0027】

また、本発明のDNAは、いかなる方法で得られるものであってもよい。例えばmRNAから調製される相補DNA(cDNA)、ゲノムDNAから調製されるDNA、化学合成によって得られるDNA、RNAまたはDNAを鑄型としてPCR法で増幅させて得られるDNAおよびこれらの方を適当に組み合わせて構築されるDNAをも全て包含するものである。

【0028】

本発明のDNAは、常法に従ってヒト由来PGISのmRNAからcDNAをクローニングする方法、ゲノムDNAを単離してスプライシング処理する方法、化学合成する方法等により取得することができる。

【0029】

(1) 例えば、ヒト由来PGISのmRNAからcDNAをクローニングする方法としては、以下の方法が例示される。

【0030】

まず、ヒト動脈血管細胞などヒト由来PGISを产生(分泌)する細胞を培養し、その培養液から該PGISをコードするmRNAを調製する。mRNAの調製は、例えばグアニジンチオシアネート法[Chirgwin, J. M. et al., Biochem., 18, 5294 (1979)]、熱フェノール法もしくはAGPC法等の公知の方法を用いて調製した全RNAをオリゴ(dT)セルロースやポリU-セファロース等によるアフィニティクロマトグラフィーにかけることによって行うことができる。

【0031】

次いで得られたmRNAを鑄型として、例えば逆転写酵素を用いる等の公知の方法〔例えばOkayama, H. らの方法 {Okayama, H. et al., Mol. Cell. Biol., 2, 161 (1982) 及び同誌 3, 280 (1983)} やGubler, U. と Hoffman, B. J. の方法 {

Gubler, H. and Hoffman, B. J., Gene, 25, 263 (1983) | が例示される。] で c DNA鎖を合成し、c DNAの二本鎖c DNAへの変換を行う。このc DNAをプラスミドベクターもしくはファージベクターに組み込み、大腸菌を形質転換して、あるいはインビトロパッケージング後大腸菌に形質移入（トランスフェクト）することによりc DNAライブラリーを作製する。

【0032】

ここで用いられるプラスミドベクターとしては、宿主内で複製保持されるものであれば特に制限されず、また用いられるファージベクターとしても宿主内で増殖できるものであれば良い。常法的に用いられるクローニング用ベクターとして pUC119, λgt10, λgt11等が例示される。ただし、後述の免疫学的スクリーニングに供する場合は、宿主内でPGIS遺伝子を発現させうるプロモーターを有したベクターであることが好ましい。

【0033】

プラスミドにc DNAを組み込む方法としては、例えば Maniatis, T. ら, モレキュラークローニング, ア・ラボラトリ・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, p.239 (1982) に記載の方法などが挙げられる。また、ファージベクターにc DNAを組み込む方法としては、Hyunh, T. V. らの方法 [Hyunh, T. V., DNA Cloning, a practical approach, 1, 49 (1985) | などが挙げられる。簡便には、市販のライゲーションキット（例えば、宝酒造製等）を用いることもできる。このようにして得られる組換えプラスミドやファージベクターは、原核細胞（例えば、E. coli HB101, DH5 またはMC1061/P3等）等の適当な宿主に導入する。

【0034】

プラスミドを宿主に導入する方法としては、Maniatis, T. らのモレキュラークローニング, ア・ラボラトリ・マニュアル (Molecular Cloning, A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, p.239 (1982) に記載の塩化カルシウム法または塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。また、ファージベクターを宿主に導入する方法としてはファージDNAをインビトロパッケージングした後、増殖させた宿主に導入する方法等が

例示される。インビトロパッケージングは、市販のインビトロパッケージングキット（例えば、ストラタジーン社製、アマシャム社製等）を用いることによって簡便に行うことができる。

【0035】

上記の方法によって作製されたcDNAライブラリーから、本発明のPGISをコードするcDNAを単離する方法は、一般的なcDNAスクリーニング法を組み合わせることによって行うことができる。

【0036】

例えば、別個にヒトPGISのアミノ酸配列に対応すると考えられるオリゴヌクレオチドを化学合成したのち、これを³²Pでラベルしてプローブとなし、公知のコロニーハイブリダイゼーション法〔Crunstein, M. and Hogness, D.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 (1975)〕またはプラーカハイブリダイゼーション法〔Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p.239 (1982)〕により、目的のcDNAを含有するクローンをスクリーニングする方法、PCRプライマーを作製しPGISの特定領域をPCR法により増幅し、該領域をコードするDNA断片を有するクローンを選択する方法等が挙げられる。また、cDNAを発現しうるベクター（例えば、λgt11ファージベクター）を用いて作製したcDNAライブラリーを用いる場合には、後述の本発明PGIS抗体を用いる抗原抗体反応を利用して、目的のクローンを選択することができる。大量にクローンを処理する場合には、PCR法を利用したスクリーニング法を用いることが好ましい。

【0037】

この様にして得られたDNAの塩基配列はマキサム・ギルバート法〔Maxam, A.M. and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 560 (1977)〕あるいはファージM13を用いたジデオキシヌクレオチド合成鎖停止の方法〔Sanger, F.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467 (1977)〕によって決定することができる。PGIS遺伝子は、その全部または一部を上記のようにして得られるクローンから制限酵素等により切り出すことにより取得できる。

【0038】

(2) また、ヒト動脈血管細胞のゲノムDNAからPGISをコードするDNAを単離することによる調製方法としては、例えば以下の方法が例示される。

【0039】

ヒト動脈血管細胞を好ましくはSDSまたはプロテナーゼK等を用いて溶解し、フェノールによる抽出を反復してDNAの脱蛋白質を行う。RNAを好ましくはリボヌクレアーゼにより消化する。得られるDNAを適当な制限酵素により部分消化し、得られるDNA断片を適当なファージまたはコスミドで増幅しライブラリーを作成する。そして目的の配列を有するクローンを、例えば放射性標識されたDNAプローブを用いる方法等により検出し、該クローンからPGISの遺伝子の全部または一部を制限酵素等により切り出し取得する。

【0040】

(3) また、化学的合成による本発明のDNAの製造は、配列表配列番号11に示される塩基配列をもとにして、常法に従って行うことができる。

【0041】

さらに本発明は、上述のPGISをコードするDNAを含有する組換えベクターに関する。本発明の組換えベクターとしては、原核細胞及び／または真核細胞の各種の宿主内で複製保持または自己増殖できるものであれば特に制限されず、プラスミドベクターおよびファージベクターが包含される。

【0042】

当該組換えベクターは、簡便には当業界において入手可能な組換え用ベクター（プラスミドDNAおよびバクテリアファージDNA）に本発明のヒト由来PGISをコードするDNAを常法により連結することによって調製することができる。用いられる組換え用ベクターとして具体的には、大腸菌由来のプラスミドとして例えばpBR322, pBR325, pUC12, pUC13など、酵母由来プラスミドとして例えばpSH19, pSH15など、枯草菌由来プラスミドとして例えばpUB110, pTP5, pC194などが例示される。また、ファージとしては、 λ ファージなどのバクテリオファージが、さらにレトロウイルス、ワクシニヤウイルス、核多角体ウイルスなどの動物や昆虫のウイルス〔pVL1392, pBK283, Autographa californica 多核体ウイルス(AcNPV), Bombyx mori多核体ウイルス(BmNPV)〕が例示される。

【0043】

PGIS遺伝子を発現させPGISを生産させる目的においては、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、原核細胞および／または真核細胞の各種の宿主細胞中でPGIS遺伝子を発現し、これら蛋白質を生産する機能を有するものであれば特に制限されない。好ましくは、昆虫細胞に感染し、該細胞中でPGISを產生する昆虫ウイルス由来の発現ベクターである。

【0044】

宿主細胞として細菌、特に大腸菌を用いる場合、一般に発現ベクターは少なくともプロモーター－オペレーター領域、開始コドン、本発明PGISをコードするDNA、終止コドン、ターミネーター領域および複製可能単位から構成される。

【0045】

宿主として酵母、動物細胞または昆虫細胞を用いる場合、発現ベクターは少なくともプロモーター、開始コドン、本発明ポリペプチドをコードするDNA、終止コドンを含んでいることが好ましい。またシグナルペプチドをコードするDNA、エンハンサー配列、本発明ポリペプチドの5'側および3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、選択マーカー領域または複製可能単位などを含んでいてもよい。

【0046】

細菌中で本発明のポリペプチドを発現させるためのプロモーター－オペレーター領域は、プロモーター、オペレーターおよびShine-Dalgarno(SD)配列（例えば、AAGGなど）を含むものである。例えば宿主が大腸菌の場合、好適にはTrpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどを含むものが例示される。酵母中で本発明のPGISを発現させるためのプロモーターとしては、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターが挙げられ、宿主がバチルス属菌の場合は、SL01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーターなどが挙げられる。また、宿主が動物細胞等の真核細胞である場合、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショ

ックプロモーター、核多角体ウイルスの有するポリヘドリンプロモーターなどが挙げられる。しかし、特にこれらに限定されるものではない。また、発現にはエンハンサーの利用も効果的な方法である。

【0047】

好適な開始コドンとしては、メチオニンコドン（A T G）が例示される。

【0048】

終止コドンとしては、常用の終止コドン（例えば、T A G, T G Aなど）が例示される。

【0049】

ターミネーター領域としては、通常用いられる天然または合成のターミネーターを用いることができる。

【0050】

複製可能単位とは、宿主細胞中でその全DNA配列を複製することができる能力をもつDNAをいい、天然のプラスミド、人工的に修飾されたプラスミド（天然のプラスミドから調製されたDNAフラグメント）および合成プラスミド等が含まれる。好適なプラスミドとしては、E. coli ではプラスミドpBR322、もしくはその人工的修飾物（pBR322を適当な制限酵素で処理して得られるDNAフラグメント）が、酵母では酵母2 μ プラスミド、もしくは酵母染色体DNAが、また哺乳動物細胞ではプラスミドpRSVneo ATCC 37198、プラスミドpSV2dhfr ATCC 37145、プラスミドpdBPV-MMTneo ATCC 37224、プラスミドpSV2neo ATCC 37149等があげられる。

【0051】

エンハンサー配列、ポリアデニレーション部位およびスプライシング接合部位については、例えばそれぞれS V 4 0に由来するもの等、当業者において通常使用されるものを用いることができる。

【0052】

選択マーカーとしては、通常使用されるものを常法により用いることができる。例えばテトラサイクリン、アンピシリン、またはカナマイシン等の抗生物質耐性遺伝子等が例示される。

【0053】

本発明の発現ベクターは、少なくとも、上述のプロモーター、開始コドン、本発明のPGISをコードするDNA、終止コドンおよびターミネーター領域を連続的かつ環状に適當な複製可能単位に連結することによって調製することができる。またこの際、所望により制限酵素での消化やT4DNAリガーゼを用いるライゲーション等の常法により適當なDNAフラグメント（例えば、リンカー、他のレストリクションサイトなど）を用いることができる。

【0054】

本発明の形質転換体は、上述の発現ベクターを宿主細胞に導入することにより調製することができる。

【0055】

宿主細胞としては、例えば微生物〔細菌（例えば、エシェリキア属菌、バチルス属菌）、酵母（例えば、サッカロマイセス属など）、動物細胞および昆虫細胞など〕が挙げられる。具体的には、エシェリキア属菌ではエシェリキア・コリ（Escherichia coli）K12DH1, M103, JA221, HB101, C600, XL-1 Blue, JM109などが例示される。バチルス属菌ではバチルス・サチリス（Bacillus subtilis）207-21などが挙げられる。酵母としてはサッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5Dなどが挙げられる。動物細胞としてはサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞、ヒトFL細胞などが挙げられる。昆虫細胞としてはBmN4, Sf9などが挙げられる。好ましくは、昆虫細胞である。

【0056】

一般にDNA配列のクローニングおよびベクターの組立てのための宿主細胞としては原核細胞が好ましい。組立てられた発現ベクターは次に適當な宿主細胞に形質転換されるが、この際の宿主細胞としては原核細胞のみならず真核細胞をも使用することができる。好ましくは、昆虫細胞（BmN4, Sfなど）である。

【0057】

発現ベクターの宿主細胞への導入〔形質転換（本発明では、形質移入を含む概念で用いる。）〕は従来公知の方法を用いて行うことができる。

例えば、細菌（大腸菌，*Bacillus subtilis* 等）の場合は、例えばCohen らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 69, 2110 (1972)] 、プロトプラス法 [Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)] やコンピテント法 [J. Mol. Biol., 56, 209 (1971)] によって、*Saccharomyces cerevisiae* の場合は、例えばHinnenらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75, 1927 (1978)] やリチウム法 [J. Bacteriol., 153, 163 (1983)] によって、動物細胞の場合は、例えばGrahamの方法 [Virology, 52, 456 (1973)] 、昆虫細胞の場合は、例えばSummers らの方法 [Mol. Cell. Biol. 3, 2156-2165 (1983)] によってそれぞれ形質転換することができる。

【0058】

本発明のヒト由来PGISは、上記の如く調製される発現ベクターを含む形質転換体（本発明では形質移入体を包含する意味で使用する。）を栄養培地で培養することによって製造することができる。

【0059】

栄養培地は、宿主細胞（形質転換体）の生育に必要な炭素源、無機窒素源もしくは有機窒素源を含んでいることが好ましい。炭素源としては、例えばグルコース、デキストラン、可溶性デンプン、ショ糖などが、無機窒素源もしくは有機窒素源としては、例えばアンモニウム塩類、硝酸塩類、アミノ酸、コーンスチーブ・リカーや、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などが例示される。また所望により他の栄養素〔例えば、無機塩（例えば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウム）、ビタミン類、抗生物質（例えばアンピシリン、カナマイシン等）など〕を含んでいてもよい。

【0060】

培養は当業界において知られている方法により行われる。培養条件、例えば温度、培地のpHおよび培養時間は、PGISの最高力価が得られるように適宜選択される。

【0061】

なお、下記に宿主細胞に応じて用いられる具体的な培地および培養条件を例示するが、何らこれらに限定されるものではない。

【0062】

宿主が細菌、放線菌、酵母、糸状菌である場合、例えば上記栄養源を含有する液体培地が適当である。好ましくは、pHが5～8である培地である。

【0063】

宿主が大腸菌の場合、好ましい培地としてM9培地 [Miller. J., *Exp. Mol. Genet.*, p.431, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1972)] が例示される。かかる場合、培養は、必要により通気、攪拌をしながら、通常14～43℃、約3～24時間行うことができる。

【0064】

宿主がBacillus属菌の場合、必要により通気、攪拌をしながら、通常30～40℃、約16～96時間行うことができる。

【0065】

宿主が酵母である場合、培地として、例えばBurkholder最小培地 [Bostian. K. L. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4505 (1980)] が挙げられ、pHは5～8であることが望ましい。培養は通常約20～35℃で約14～144時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0066】

宿主が動物細胞の場合、培地として例えば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、RPMI 1640培地 [J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]、199培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)] 等を用いることができる。培地のpHは約6～8であるのが好ましく、培養は通常約30～40℃で約15～60時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0067】

宿主が昆虫細胞の場合、例えば胎児牛血清を含むGrace's 培地 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404 (1985)] 等が挙げられ、そのpHは約5～8であるのが好ましい。培養は通常約20～40℃で15～100時間行なわれ、必要により通気や攪拌を行うこともできる。

【0068】

本発明のヒト由来PGISは、上記培養により得られる培養物より以下のようにして取得できる。

【0069】

すなわち、本発明のヒト由来PGISが、培養物のうち培養液中に存在する場合は、得られた培養物を濾過または遠心分離等の方法で培養濾液（上清）を得、該培養濾液から天然または合成蛋白質を精製並びに単離するために一般に用いられる常法に従って該PGISを精製、単離する。

【0070】

単離、精製方法としては、例えば塩析、溶媒沈澱法等の溶解度を利用する方法、透析、限外濾過、ゲル濾過、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーやヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーなどの荷電を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動などの等電点の差を利用する方法などが挙げられる。

【0071】

一方、本発明ヒト由来PGISが培養された形質転換体のペリプラズムまたは細胞質内に存在する場合は、培養物を濾過または遠心分離などの常法に付して菌体あるいは細胞を集め、適当な緩衝液に懸濁し、例えば超音波やリゾチーム及び凍結融解などの方法で細胞等の細胞壁および／または細胞膜を破壊した後、遠心分離やろ過などの方法でPGISを含有する膜画分を得る。該膜画分をトリトン等の界面活性剤を用いて可溶化して粗溶液を得る。そして、当該粗溶液を先に例示したような常法を用いて処理することにより、本発明PGISを単離、精製することができる。

【0072】

また、本発明は、上述のヒト由来PGISに反応性を有する抗体に関する。本発明の抗体は、上記性質を有するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を共に包含する。本発明の抗体は、常法に従って取得することができる。

【0073】

例えば、本発明のモノクローナル抗体は、いわゆる細胞融合によって製造されたハイブリドーマから製造することができる。即ち、抗体産生細胞と骨髄細胞との間に、融合ハイブリドーマを形成させ、当該ハイブリドーマをクローン化し、ヒト由来PGISのアミノ酸配列の一部または全部を有するポリペプチドを抗原としてそれに対して特異的親和性を示す抗体を生産するクローンを選択することによって製造される。その操作は、免疫抗原として本発明のヒト由来PGISを使用する以外は、従来既知の手段を用いることができる。

【0074】

免疫原は、例えば完全フロインドアジュバントと混和後、動物の免疫用として使用される。動物としては、例えばマウス、ラット、ウサギ等が例示される。免疫は動物の皮下、筋肉内、腹腔内に約5～200μg／回を注射することにより行われる。初回免疫から約1～2週間毎に1～4度免疫を行い、さらに約1～4週間後に最終免疫を行う。最終免疫より約3～5日後、免疫動物から抗体産生細胞を分取する。抗体産生細胞としては、脾細胞、リンパ節細胞等が挙げられる。

【0075】

骨髄細胞としては、例えばマウス、ラット、ヒト由来のものが使用される。例えばマウスミエローマP3・X63・Ag8、P3・X63・Ag8-U1、P3・NS1-Ag4、SP2/0-Ag14、X63-Ag8・653等が例示される。抗体産生細胞と骨髄細胞とは同種動物由来であることが好ましい。

【0076】

細胞融合は、例えばネイチャー、第266巻、550頁（1977）に記載の方法またはこれに準じる方法によって行われる。この際、30～50%ポリエチレンゲリコール（平均分子量1,000～4,000）を用いて30～40℃の温度下、約1～3分間程度反応させることによって行われる。

【0077】

細胞融合によって得られた細胞は目的とするモノクローナル抗体を产生するクローンのスクリーニングに付される。すなわち、当該細胞を例えばマイクロプレート中で培養し、増殖の見られたウェルの培養上清中の抗体価を、例えば酵素抗体法等によって測定し、適切な抗体を產生しているウェルを得る。このようなウ

エルから更に例えば限界希釈法によってクローニングを行ってクローンを得る。本発明のモノクローナル抗体は、当該ハイブリドーマ細胞クローンを通常の培養方法、高密度培養方法あるいはスピナーフラスコ培養方法等の培養上清よりプロテインA結合担体あるいは抗マウスイムノグロブリン結合担体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより精製することにより得られる。

【0078】

また培養したハイブリドーマ細胞を、予めプレステン処理した同系マウス腹腔に注射することにより腹水として得られ、これを硫安塩析した後D E A E イオン交換クロマトグラフィーによりI g G画分として精製し調製することができる。

【0079】

【発明の効果】

本発明は、ヒト由来のP G I Sのアミノ酸配列、該配列を有する酵素をコードするD N Aの塩基配列を初めて明らかにするものである。かかるアミノ酸配列および塩基配列の解明に基づいて、本発明は遺伝子工学的手法によるP G I Sの製造法およびこれに関連する発現系を提供する。

【0080】

本発明のP G I S及びこれをコードするD N Aは、
①P G I Sの分子あるいは遺伝子レベルでの物理化学的性状、及び生物学的性状の解析、

【0081】

②P G I Sの產生調節メカニズム、P G I Sに係るP G I 2 の產生調節メカニズムの解析、及び

【0082】

③P G I 2 とT X A 2 との產生量不均衡に起因すると考えられる各種循環器系疾患の原因究明および該疾患に対する治療薬の開発のための分子あるいは遺伝子レベルでの解析、
のための試薬として有用である。

【0083】

また、P G I Sあるいはそのm R N Aに体内組織発現レベルおよび分布を測定

するための診断薬として有用である。

【0084】

さらには、それら自身、それらの断片、あるいはそれらの修飾体を疾患部位特異的に生体内に導入することにより、PGI₂の產生レベルを高めることによる、例えば血栓症、心筋梗塞、動脈硬化、狭心症等の各種循環器系疾患に対する治療薬としての利用が期待される。

【0085】

さらに、本発明のヒト由来PGISをコードするDNAを含有する組換えベクター、および該ベクターで形質転換された宿主細胞からなるPGISの発現系は、ヒト由来PGISの簡便かつ効率的な量産を可能とする遺伝子工学的製造に有用である。

【0086】

また、本発明のヒト由来PGIS抗体は、ヒト由来PGISの精製、免疫組織化学的、病因解析〔各種組織（子宮、心臓、骨格筋、肺、前立腺等）の特異染色〕に有用である。

【0087】

本発明の実施例において用いるプラスミド、制限酵素等の酵素、T4DNAリガーゼ及び他の物質は市販のものであり、常法に従って使用することできる。cDNAのクローニング、塩基配列の決定、宿主細胞のトランスフェクション、形質移入体の培養、得られる培養物からのPGISの採取、精製等および抗体の取得に用いられた操作についても当業者によく知られているものであるか、文献により知ることのできるものである。

【0088】

また、本発明で用いるpHPGIS36（PBJT-BA-4、受託番号FERM BP-4653）およびpHPGIS135（PBJT-BA-5、受託番号FERM BP-4654）は、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に国際寄託されている。

【0089】

【実施例・参考例】

以下、本発明を具体的に説明するため実施例および参考例を示すが、本発明はこれら実施例等によって何ら制限されるものではない。

【0090】

実施例1 cDNA塩基配列の決定

(1) λ hPGIS141の作製

ヒトゲノムライブラリー (Genomic Lung fibroblast cell line, WI38、クローンテック社製) を 2×10^5 PFU 程まで、本発明者が先に作製したウシcDNA (Tanabe, T., Hara, S., Miyata, A., Brugger, R., and Ullrich, V. (1993) in Abstract book of 3rd international conference on eicosanoid and other bioactive lipids in cancer, inflammation and radiation Injury, pp. 137 参照) をプローブとして、プラーカハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。

【0091】

その結果、4つのポジティブシグナルを得て、そのうちの1つを単一プラーカにまで単離した。これを液体培養することにより大量のファージDNAを調製して、精製後種々の制限酵素消化によるマッピングを行った。サザンハイブリダイゼーションにより、エクソンを含むフラグメントを同定して、DNAシークエンスによる構造解析を行い、最終的に単離されたクローン (λ hPGIS141) がヒトPGISをコードするものであることを確認した。

【0092】

このようにして得られた λ hPGIS141について、制限酵素サイトマッピングや塩基配列決定など構造解析した結果、 λ hPGIS141はウシPGISのcDNAの塩基配列の673～855に相当する領域を含んでいることが確認された (配列番号8)。

【0093】

この得られた λ hPGIS141のcDNAフラグメントの塩基配列をもとに、配列表配列番号1～4に示す配列を有するプライマー [配列番号1:P1プライマー(674-689)、配列番号2:P2プライマー(699-718)、配列番号3:P3プライマー(696-713)、配列番号4:P4プライマー(805-822)] を合成した。

【0094】

(2) PCR法によるcDNAの増幅

該プライマーを用いて、ヒト動脈血管内皮細胞（以下、H A E Cという。クランボー社製） $1\mu\text{g}$ のpoly(A)⁺RNA（mRNA）を鑄型として、3'下流領域および5'上流領域のcDNAをそれぞれPCR法により増幅した（Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 1479-1484）。

【0095】

3'下流領域に相当するcDNAを増幅するために、まずdT₁₇アダプター（5'-GACTCGAGTCGACATCGA(T)₁₇-3'、配列番号5）でプライムし、伸長作成したファーストcDNA鎖をP1プライマー(674-689)およびアダプタープライマー（配列番号6）で、ついでP2プライマー(699-718)及びアダプタープライマー（配列番号6）を用いて増幅した。一方、5'上流領域のcDNAは5'RACEシステム（GIBCO BRL）を用いて増幅した。プロトコールに従って、ホモメリックdCテイルをファーストcDNA鎖につけて、更にセカンドcDNA鎖をアダプタープライマー（5'-(CUA)₄GGCCACCGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'）（配列番号7）を用いて作成した。第1段階の増幅はP4プライマーとアダプタープライマー（配列番号7）とを用いて行った。次いで第2段階の増幅をP3プライマーとアダプタープライマー（配列番号7）とを用いて行った。なお、PCR法は下記のサイクロプロファイルに従って35サイクル行った。

【0096】

変性	94℃, 1分
アニーリング	54℃, 1分
伸長	72℃, 3分

【0097】

各PCR生成物（3'下流領域増幅産物、5'下流領域増幅産物）から一部を取り出して、それを1%アガロースゲルを用いた電気泳動で精製を行った。ウシPGISのcDNA（pBPGISI）をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、該プローブにクロスハイブリダイズしたバンドからDNAを抽出して、得られたDNAをpBluescriptII SK(-)にクローン化した。

【0098】

すなわち、以下の手順に従ってクローニングを行った。

- (1)電気泳動後、ゲルからシグナルの見られたバンドを切り出す。
- (2)アガラーゼ消化を40℃で1時間行う（アガラーゼ1unit/100μlゲル）。
- (3)DNAをフェノールで抽出した後、エタノール沈殿する。
- (4)該DNAエタノール沈殿を滅菌水に溶解後、37℃で1時間のポリヌクレオチドカイネース処理する。
- (5)クレノウフラグメントにより、末端の修復を行う（16℃、1時間）。
- (6)Takara ligation kitによるライゲーションを行う。
- (7)常法に従い、トランスフォーメーションを行う。
- (8)プレートにまく。
- (9)常法に従ってレプリカを作成する。
- (10)レプリカのニトロセルロースフィルターをウシPGISのcDNAをプローブとして用いて、常法に従ってコロニーハイブリダイゼーションを行う。

【0099】

尚、ハイブリダイゼーションは、 $6 \times SSC$ [$1 \times SSC$ は、0.15M NaCl、15mM クエン酸ナトリウム（pH 7.0）を含有する]， $5 \times Denhardt's$ 溶液， $250 \mu g/ml$ サケ精子DNA，0.1% SDSおよびランダムプライミング法によりラベル化したcDNAのフラグメント（ 10^6 cpm/ml）の中で60℃で行った。得られたフィルターに対して $3 \times SSC$ ，0.1% SDS中で室温下、5分間の洗浄を2回、それから $0.1 \times SSC$ ，0.1% SDS中で50℃、15分間の洗浄を2回行った。該フィルターを風乾し、-80℃で12～16時間、増感スクリーンを用いてフジX線フィルムを当てた。

【0100】

得られたインサートDNAをpBluescriptII SK(-)にサブクローニングした。

【0101】

これにより、ヒト由来PGISの3'下流領域のDNAを含有するクローンpHPGIS135および5'上流領域のDNAを含有するクローンpHPGIS36を取得した。次に、サンガー法 [Sanger, F., Nickle, S., and Coulson,

A.R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467] に従って、Taq dye プライマー サイクル配列キット（アプライドバイオシステムズ社製）を用いてモデル 373A DNA シーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製）によつて、各クローンの挿入DNAの塩基配列を決定した。これにより、pH PGIS 36 クローンはインサートDNA配列として、5' 側にアダプター配列を配したヒトPGISのcDNAの740 bp の塩基配列を有している（配列番号9）ことがわかり、これにより ATG を翻訳開始配列（Met）とする 238 アミノ酸残基からなる PGIS のアミノ酸の部分配列が解明された。

【0102】

また、pH PGIS 135 クローンはインサートDNA配列として、3' 側にアダプター配列を配したヒトPGISのcDNAの1277 bp の塩基配列を有している（配列番号10）ことがわかり、これにより 226 番目のアスパラギン酸から始まるカルボキシル基側領域の PGIS の部分アミノ酸配列が解明された。後記配列表の配列番号9に pH PGIS 36 クローンに含有されるヒトPGISのcDNAの塩基配列およびこれからコードされるアミノ酸配列を、配列番号10に pH PGIS 135 クローンに含有されるヒトPGISのcDNAの塩基配列およびこれからコードされるアミノ酸配列を記載する。なお、図1にヒトPGISのcDNAの制限酵素マップおよびλhPGIS 141, pH PGIS 36 およびpH PGIS 135 に含まれるDNAが当該ヒトPGISのcDNAのどの領域に相当するかを示す。また、図2にpH PGIS 36 の制限酵素マップを、図3にpH PGIS 135 の制限酵素マップを示す。

【書類名】 明細書

【0103】

以上のクローニングにより得られたヒトPGISのcDNAは、翻訳開始コドン周辺に Kozakら [Nucleic Acids Res. 12, 857-872 (1984)] によって示された真核生物の開始コドンのコンセンサス配列を有しており、終止コドンに相当する TGA コドンが 500 コドン後に存在していた。これらのことから、クローニングされたヒトPGISのcDNAは、配列番号12に示すように 500 アミノ酸残基をコードする 1500 bp の有する 1977 bp であることが判り、これ

によりコードされるタンパクの分子量は約57,000であろうと推測された。

【0104】

また、当該DNAによりコードされるアミノ酸配列を、本発明者らによって別にクローニングされたウシ由来のPGISのアミノ酸配列と比較したところ、約88%のホモロジーを有していることがわかった。本発明者らによるウシPGISの研究から、ウシPGISは、チトクロムP450 7ファミリー(CYP7)に属するコレステロール7 α -ヒドロキシラーゼと31%のホモロジーを有しており、特にチトクロムP450のヘム結合部位(第5配位子)である441位のCys残基周辺領域が保存されていることが判っているが、本発明のヒトPGISも同様にその領域に相当するアミノ酸配列が保存されており、かかる領域がPGISの活性に重要な役割を担うものと考えられる。

【0105】

また、ウシPGISは、コレステロール7 α -ヒドロキシラーゼとは31%のホモロジーがあるものの、チトクロムP450ファミリーに属するヒトトロンボキサンシンターゼとは16%のホモロジーしか、また既知のチトクロムP450タンパクのいずれとも40%以上のホモロジーは有しないことから、チトクロムP450スーパーファミリーの中の新しいファミリーであることが予想されるが、ヒトPGISも同様にこの新しいファミリーに属するものと考えられる。

【0106】

このような構造活性相関の探索は医薬品の研究開発に不可欠なものであるが、かかる探索は、ヒトPGISの一次構造が明らかになることにより初めて成しえるものである。従って、ヒトPGISの一次構造を初めて開示する本発明は、研究の分野のみならず産業上においても極めて重要な意義を有する。

【0107】

実施例2 ヒトPGISの発現

(1) ヒトPGISの発現ベクターの構築

得られたpHPGIS36クローンおよびpHPGIS135クローンそれより、cDNAインサート領域を適切な制限酵素を用いて切り出し精製する。得られる両フラグメントを熱変性(95℃、10分間)した後、アニーリングさ

せる。次にDNAポリメラーゼにより、オーバーラップ領域を合成開始領域として、当該領域から5'方向および3'方向の両方向に複製を行う。得られた全長cDNAを鋳型として開始コドン、終止コドンそれぞれの領域よりプライマーを合成してPCRを行う。その際、プライマーの3'には適当な制限酵素サイトをアンカーポジションとして構築する。

【0108】

得られたPCR産物を精製後、それらの塩基配列を確認するとともに、BamHIおよびSmaI(BglII)にて消化を行い、BamHI-SmaI(BglII)フラグメントを得る。当該BamHI-SmaI(BglII)フラグメントをあらかじめBamHI-SmaI処理したpVL1393発現ベクターのBamHI-SmaI部位に導入する。作成された組換えプラスミド(PGIS7)を制限酵素マッピングおよびDNA配列分析によってキャラクタライズする。

【0109】

(2) バキュロウイルス発現システム

Sf9細胞(インビトロゲン社製)を10%ウシ胎児血清、0.33%イーストレイト及び0.33%ラクトアルブミンハイドロライセートを含有するグレースインセクト培地を用いて27℃で単層培養する。組換えウイルスを產生させるため、Sf9細胞(1.5×10⁶細胞)組換えプラスミド(PGIS7、50μg)と野生型バキュロウイルスDNA(AdNPV; 1μg)とを混合してリソ酸カルシウム沈澱法によりトランスフェクトした。組換えバキュロウイルスは、プラークアッセイとプローブとして³²P-ラベルしたPGISのcDNAフラグメントを使用するスロットハイブリダイゼーションとを組み合わせることによって単離し、さらに増幅させる。

【0110】

該Sf9細胞を野生型バキュロウイルスまたは組換えバキュロウイルスにインフェクションする。インフェクションして3日後、細胞を集め(2×10⁸細胞)、10μMヘミンを含有する血清含有培地中、または含有しない血清含有培地中で5時間インキュベーションする。

【0111】

得られた細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、-80℃に保存する。細胞のミクロソーム画分を HaurandとUllrich らの方法に従って調製する(J. Biol. Chem. 260, 15059-15067)。得られた細胞 (2×10^8 細胞) を 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0), 10 mM EDTA, 5 mM グルコース, 0.1 mM デチオスレイトール (DTT), 1.15% KC1, 2 μg/ml ロイペプチド, 2 μg/ml ペプスタチン, 10 μg/ml 大豆トリプシン阻害剤および 44 μg/ml フェニルメチルスルフォニルフルオライドからなる溶液 20 ml でホモジナイズし、Branson sonifier モデル 450 を用いて 30 秒間、4 回の超音波処理をする。

【0112】

得られたホモジネートを 7,000 × g で 15 分間遠心して得られた上清をさらに 105,000 × g の超遠心に 60 分間かける。得られる沈殿を 20% グリセロール, 1 mM DTT および 1 mM EDTA を含有する 10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) 3 ml にソニケートすることにより懸濁した。蛋白質の濃度はウシ血清アルブミンをスタンダードとして用いて Lowry 法によって測定し、イムノプロット分析および P GIS アッセイ用の溶液を 5 mg/ml に調製する。

【0113】

(3) ウエスタン イムノプロット分析

インフェクションされた Sf9 細胞とヒト血小板のミクロソーム画分を Laemmli の方法 [Nature 227, 680-685 (1979)] に従って 10% SDS-PAGE にかける。泳動されたタンパクを Towbin らの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354 (1979)] に従ってポリビニリデンジフルオライド (PVDF) 膜 (イモビロン, ミリポア) 上に電気泳動的に移す。10% ウマ血清含有トリス塩酸緩衝生理食塩水 (TBS) (pH 7.4) を室温下で 30 分間前処理し、3% スキムミルクを含む TBS 中で、プロットメンブレンをウシ P GIS に対するポリクローナル抗体と一緒にインキュベーションする。

【0114】

0.05% Tween 20 を含有する TBS で洗浄した後、メンブレンをホー

スラディッシュペルキシダーゼ（ベクター・ラボラトリーズ社製）とコンジュゲートする抗マウス IgGウマ抗体と3%スキムミルクを含有するTBSで37℃で30分間インキュベーションする。0.05%Tween20を含有するTBSで、さらにTBSで十分洗浄した後、免疫反応陽性のバンドをイムノステイニングHRPキット（コニカ製）で検出する。

【0115】

実施例3 抗PGISポリクローナル抗体の作製

0.5mlのリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解したPGISと等量のアジュバンドを乳化させた後、これをウサギに皮下注射する。その後、10日置きに同様の皮下注射を2回行い、最後の皮下注射から10日後に当該ウサギの血を採取する。該ウサギの血より調製したウサギ抗PGIS血清から抗PGIS/IgGをプロテインAセファロース4B（バイオラッド社製）を用いることによって精製、取得する。

【0116】

実施例4 抗PGISモノクローナル抗体の作製

①マウス

近交系BALB/c系マウス雄5週令を入手し、動物飼育チェンバー内（23+1℃、湿度70%）で標準ペレットを使用して飼育し、給水は任意に行う。

【0117】

②免疫原

ヒト由来の精製PGISを使用した。ヒトPGISはダルベッコPBSで1mg/mlとなるように調製し、100μgずつ試験管に分注し、使用するまで-80℃で凍結保存する。

【0118】

③免疫方法

ヒトPGIS100μg/0.5mlと同量のFreund's complete adjuvantを混合し、乳化状にした抗原20μgを5匹の5週令雄のBALB/cマウスの腹腔および背中の皮下十数カ所に2週間毎に2か月間投与する。2か月間の免疫の後、抗体価を測定し、抗体価の高いマウスを選んでさらに1週間毎に50μg

、 $100\mu g$ 、 $200\mu g$ を腹腔内投与し追加投与を行う。

【0119】

また、別の2匹のマウスに同様に2か月の免疫の後、1か月あけて $100\mu g$ を腹腔内に投与し、さらに1週間後 $100\mu g$ を静注注射し追加免疫を行う。

【0120】

④細胞融合

最終免疫から3日後にBALB/cマウスの摘脾を行い、EMEM培養液中で脾細胞の浮遊液を作成する。次いで脾細胞をEMEM培養液で4回洗浄した後、細胞数を算定する。

【0121】

細胞融合は、2-amino-6-oxy-8 azapuraine (8-Azaguanine) 耐性のBALB/cマウス骨髓腫由来培養細胞株 (P3-X63-Ag8·653：以下、X63細胞と略す) を親細胞株として用いる。X63細胞は、非効化した胎児ウシ血清 (FCS) 5%を含むRPMI-1640培養液 ($20\mu g/ml$ 、8-Azaguaine含有) で継代培養し、対数増殖期のX63細胞を用いRPMI-1640培養液で3回洗浄した後、細胞数を算定する。

【0122】

細胞融合は、ポリエチレングリコール-4000をRPMI-1640培養液で50(w/v)%濃度となるように溶解して使用する。

【0123】

脾細胞とX63細胞の比が10:1となるように混合し、 $1500 rpm$ で5分間遠心後、上清を除去し、細胞ペレットをよく懸濁し、ポリエチレングリコールを用いて、KohkerとMilsteinの方法に準じて細胞融合を行う。その後、脾細胞が 3.5×10^6 個/mlとなるように、HAT選択培地 (10%FCSを添加したRPMI-1640培養液に $1 \times 10^{-4}M$ ヒポキサンチン、 $4 \times 10^{-7}M$ アミノブテリン及び $1.6 \times 10^{-5}M$ チミジンを含有) に浮遊させる。次いで、細胞浮遊液の $100\mu l$ ずつを96穴マイクロテストプレートの各穴に分注した後、炭酸ガスインキュベータ (37°C、湿度95%、8%炭酸ガス) で培養を行う。培養開始後、1日めと2日めにHAT培地を各穴に1滴ずつ、また培養開始後

7日めと9日めにHAT培地を各穴に2滴ずつ添加してさらに培養を行う。

【0124】

⑤スクリーニング

培養開始後、10日めより細胞のクローンが出現し、抗体産生に有無を確認するため、ハイブリドーマの培養上清を用いて抗原抗体反応試験を行う。

【0125】

すなわち、ハイブリドーマの培養上清とヒトPGIS抗原液とを $50\mu l$ ずつUボトムノマイクロタイタープレートに入れ、さらに抗マウスイムノグロブリン抗体を結合させたセファロース4Bの20%懸濁液を $50\mu l$ を加えて室温で1時間攪拌した後、10分間静置する。次に抗マウスイムノグロブリン抗体結合セファロース4Bがウェルに底に完全に沈むのを確認した後、この上清を $20\mu l$ とり、この上清中に残存するヒトPGISの濃度をPGISELISA系で測定する。このとき、ハイブリドーマの培養上清中にヒトPGISに対する抗ヒトPGISモノクローナル抗体が存在する場合には、ヒトPGISと抗ヒトPGISモノクローナル抗体とが反応し、さらに抗マウスイムノグロブリン抗体結合セファロース4Bとが抗原抗体複合体を介して沈降し、上清中に残存するヒトPGISの濃度が減少し、抗ヒトPGISモノクローナル抗体の存在が証明される。

【0126】

参考例1 RNAプロット分析

幾種かのサイトカインの、HAE Cに由来するヒトPGIS mRNAの発現に対する影響をみるためにRNAプロットハイブリダイゼーション分析を行った。

【0127】

まず、幾種かのサイトカイン [IL-1 α (1ng/ml)、IL-1 β (1ng/ml)、IL-6 (2.5ng/ml)、TNF- α (5ng/ml)、TNF- β (1ng/ml)] で24時間のインキュベーション処理した各HAE C由来の全RNA ($30\mu g$)をホルムアミドで変性して、1.5%ホルムアルデヒドを含む1%寒天ゲル上で電気泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。プローブ [pHPGIS 135およびグリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH)] をランダムプライミング法 [Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983) Anal. Bioc

hem. 132, 6-13] を用いて、 [α - ^{32}P] dCTPで標識した。

【0128】

次に、 Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, p1479-1484 (1991) に記載の方法に従ってハイブリダイゼーションを行った。得られた膜は、最後に 0. 1% SDSを含有する 60℃の 0. 1×SSC (0. 15M NaCl, 0. 015M クエン酸ナトリウム, pH 7. 0) で洗浄し、風乾後オートラジオグラフをとった。結果を図4に示す。HAE C由来のヒトPGISのmRNAの主なバンドは、約 6 kb のところに認められ、その他 3 本のマイナーバンドが認められた (3. 2, 2. 5 および 1. 7 kb)。実験の結果、IL-1 α 、IL-1 β もしくは IL-6とともに 24 時間インキュベーションしたヒトPGISのmRNA の発現は、サイトカイン処理しなかったコントロールと比較して約 2 倍上昇していることが認められた。しかし、サイトカインによる PG I₂ 産生量の増大は、サイトカインによる PGIS の発現、産生の増大によるものと考えられる。逆に、サイトカインによる処理は、PGIS の発現を高めることにより PGIS の活性を増大させ、ひいては PG I₂ 産生を促進するのに極めて有効な方法である。

【0129】

参考例2 PGISのmRNAの体内分布

ヒト体内における PGIS の mRNA の発現分布をみるために、 RNA ブロット分析を行った。具体的には、クローンテック社より、ヒト各組織ポリ A RNA を電気泳動してプロッティングしてあるフィルターを購入し、 hPGIS135 を上述の方法により ^{32}P 標識化し、前述と同様の条件を用いてノーザンプロットハイブリダイゼーションを行った。

【0130】

結果を図5および図6に示す。この結果から、 PGIS の mRNA はヒト組織で広く、特に子宮、心臓、骨格筋、肺、前立腺に豊富に発現しており、また小腸、腎臓、肝臓及び脳にもわずかであるが有意なレベルで発現していることが確認された。これらの結果は、従来の PGIS の酵素活性および免疫反応による組織分布の報告と一致しており、 PGIS が血管系での作用に加えて様々な生理学的

役割を担っていることが示唆される。また、図4で示された6 kbの強い主なバンドと3本の弱いバンドは上記全ての組織において観察されたが、弱いバンドの相対的な濃さは組織間でさまざまであった。このような転写物の多様な存在様式は、mRNAの別のスプライシングが生じている可能性もしくはプロスタグランジンエンドペルオキシダーゼにおいて見つかったような類似遺伝子（アイソザイム）の存在の可能性を示唆するものである。

【0131】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GGGACAAGGA CCACAT

16

【0132】

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CAAAAGTCGC CTGTGGAAGC

20

【0133】

配列番号：3

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CACAGGCGAC TTTTGACA

18

【0134】

配列番号：4

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TGCCTGCATC TCCTCTGA

18

【0135】

配列番号：5

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACTCGAGTC GACATCGATT TTTTTTTTTT TTTTT

35

【0136】

配列番号：6

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GACTCGAGTC GACATCG

17

【0137】

配列番号：7

配列の長さ：48

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴：36, 37, 41, 42, 46及び47番目の記号Nはそれぞれイノシンを示す。

配列

CUACUACUAC UAGGCCACGC GTCGACTAGT ACCGGNNNGGG NNNGGNNG 48

【0138】

配列番号：8

配列の長さ：183

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：λ h P G I S 1 4 1

配列の特徴

特徴を表す記号：peptide

存在位置：1..183

特徴を決定した方法：S

配列

GGG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT GTC AAA AGT CGC CTG TGG AAG CTG 48

Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu

5

10

15

CTA TCC CCA GCC AGG CTG GCC AGG CGG GCC CAC CGG AGC AAA TGG CTG 96

Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu

20

25

30

GAG AGT TAC CTG CTG CAC CTG GAG GAG ATG GGT GTG TCA GAG GAG ATG 144

Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met

35

40

45

CAG GCA CGG GCC CTG GTG CTG CAG CTG TGG GCC ACA CAG

183

Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gln

50

55

60

【0139】

配列番号：9

配列の長さ：792

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：pHPGIS36

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：20..790

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：20..790

特徴を決定した方法：S

配列

CTACTACTAC TAGGCCACGC GTCGACTAGT ACGGGGGGGG GGGGGGGGGG GCAGCCCCGC 60

CAGCCCCGCC AGCCCCGCG ATG GCT TGG GCC GCG CTC CTC GGC CTC CTG 109

Met Ala Trp Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu

5

10

GCC GCA CTG TTG CTG CTG CTA CTG AGC CGC CGC CGC ACG CGG CGA 157

Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Arg Arg Arg Thr Arg Arg
 15 20 25
 CCT GGT GAG CCT CCC CTG GAC CTG GGC AGC ATC CCC TGG TTG GGG TAT 205
 Pro Gly Glu Pro Pro Leu Asp Leu Gly Ser Ile Pro Trp Leu Gly Tyr
 30 35 40
 GCC TTG GAC TTT GGA AAA GAT GCT GCC AGC TTC CTC ACG AGG ATG AAG 253
 Ala Leu Asp Phe Gly Lys Asp Ala Ala Ser Phe Leu Thr Arg Met Lys
 45 50 55
 GAG AAG CAC GGT GAC ATC TTT ACT ATA CTG GTT GGG GGC AGG TAT GTC 301
 Glu Lys His Gly Asp Ile Phe Thr Ile Leu Val Gly Gly Arg Tyr Val
 60 65 70
 ACC GTT CTC CTG GAC CCA CAC TCC TAC GAC GCG GTG GTG TGG GAG CCT 349
 Thr Val Leu Leu Asp Pro His Ser Tyr Asp Ala Val Val Trp Glu Pro
 75 80 85 90
 CGC ACC AGG CTC GAC TTC CAT GCC TAT GCC ATC TTC CTC ATG GAG AGG 397
 Arg Thr Arg Leu Asp Phe His Ala Tyr Ala Ile Phe Leu Met Glu Arg
 95 100 105
 ATT TTT GAT GTG CAG CTT CCA CAT TAC AGC CCC AGT GAT GAA AAG GCC 445
 Ile Phe Asp Val Gln Leu Pro His Tyr Ser Pro Ser Asp Glu Lys Ala
 110 115 120
 AGG ATG AAA CTG ACT CTT CTC CAC AGA GAG CTC CAG GCA CTC ACA GAA 493
 Arg Met Lys Leu Thr Leu Leu His Arg Glu Leu Gln Ala Leu Thr Glu
 125 130 135
 GCC ATG TAT ACC AAC CTC CAT GCA GTG CTG TTG GGC GAT GCT ACA GAA 541
 Ala Met Tyr Thr Asn Leu His Ala Val Leu Leu Gly Asp Ala Thr Glu
 140 145 150
 GCA GGC AGT GGC TGG CAC GAG ATG GGT CTC CTC GAC TTC TCC TAC AGC 589
 Ala Gly Ser Gly Trp His Glu Met Gly Leu Leu Asp Phe Ser Tyr Ser
 155 160 165 170

TTC CTG CTC AGA GCC GGC TAC CTG ACT CTT TAC GGA ATT GAG GCG CTG	637	
Phe Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Ile Glu Ala Leu		
175	180	185
CCA CGC ACC CAT GAA AGC CAG GCC CAG GAC CGC GTC CAC TCA GCT GAT	685	
Pro Arg Thr His Glu Ser Gln Ala Gln Asp Arg Val His Ser Ala Asp		
190	195	200
GTC TTC CAC ACC TTT CGC CAG CTC GAC CGG CTG CTC CCC AAA CTG GCC	733	
Val Phe His Thr Phe Arg Gln Leu Asp Arg Leu Leu Pro Lys Leu Ala		
205	210	215
CGT GGC TCC CTG TCA GTG GGG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT GTC AAA	781	
Arg Gly Ser Leu Ser Val Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys		
220	225	230
AGT CGC CTG TG	792	
Ser Arg Leu		
235		

【0140】

配列番号：10

配列の長さ：1296

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

株名：pHPGIS135

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：3..827

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：peptide

存在位置：3..827

特徴を決定した方法：S

配列

GG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT GTC AAA AGT CGC CTG TGG AAG CTG			47
Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu			
5	10	15	
CTA TCC CCA GCC AGG CTG GCC AGG CGG GCC CAC CGG AGC AAA TGG CTG			95
Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu			
20	25	30	
GAG AGT TAC CTG CTG CAC CTG GAG GAG ATG GGT GTG TCA GAG GAG ATG			143
Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met			
35	40	45	
CAG GCA CGG GCC CTG GTG CTG CAG CTG TGG GCC ACA CAG GGG AAT ATG			191
Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gln Gly Asn Met			
50	55	60	
GGT CCC GCT GCC TTC TGG CTC CTG CTC TTC CTT CTC AAG AAT CCT GAA			239
Gly Pro Ala Ala Phe Trp Leu Leu Phe Leu Leu Lys Asn Pro Glu			
65	70	75	
GCC CTG GCT GTC CGC GGA GAG CTC GAG AGT ATC CTT TGG CAA GCG			287
Ala Leu Ala Ala Val Arg Gly Glu Leu Glu Ser Ile Leu Trp Gln Ala			
80	85	90	95
GAG CAG CCT GTC TCG CAG ACG ACC ACT CTC CCA CAG AAG GTT CTA GAC			335
Glu Gln Pro Val Ser Gln Thr Thr Leu Pro Gln Lys Val Leu Asp			
100	105	110	
AGC ACA CCT GTG CTT GAT AGC GTG CTG AGT GAG AGC CTC AGG CTT ACA			383
Ser Thr Pro Val Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Ser Leu Arg Leu Thr			
115	120	125	

GCT	GCC	CCC	TTC	ATC	ACC	CGC	GAG	GTT	GTG	GTG	GAC	CTG	GCC	ATG	CCC		431
Ala	Ala	Pro	Phe	Ile	Thr	Arg	Glu	Val	Val	Val	Asp	Leu	Ala	Met	Pro		
130								135							140		
ATG	GCA	GAC	GGG	AGA	GAA	TTC	AAC	CTG	CGA	CGT	GGT	GAC	CGC	CTC	CTC		479
Met	Ala	Asp	Gly	Arg	Glu	Phe	Asn	Leu	Arg	Arg	Gly	Asp	Arg	Leu	Leu		
145								150							155		
CTC	TTC	CCC	TTC	CTG	AGC	CCC	CAG	AGA	GAC	CCA	GAA	ATC	TAC	ACA	GAC		527
Leu	Phe	Pro	Phe	Leu	Ser	Pro	Gln	Arg	Asp	Pro	Glu	Ile	Tyr	Thr	Asp		
160				165					170						175		
CCA	GAG	GTA	TTT	AAA	TAC	AAC	CGA	TTC	CTG	AAC	CCT	GAC	GGA	TCA	GAG		575
Pro	Glu	Val	Phe	Lys	Tyr	Asn	Arg	Phe	Leu	Asn	Pro	Asp	Gly	Ser	Glu		
180									185						190		
AAG	AAA	GAC	TTT	TAC	AAG	GAT	GGG	AAA	CGG	CTG	AAG	AAT	TAC	AAC	ATG		623
Lys	Lys	Asp	Phe	Tyr	Lys	Asp	Gly	Lys	Arg	Leu	Lys	Asn	Tyr	Asn	Met		
195								200							205		
CCC	TGG	GGG	GCG	GGG	CAC	AAT	CAC	TGC	CTG	GGG	AGG	AGT	TAT	GCG	GTC		671
Pro	Trp	Gly	Ala	Gly	His	Asn	His	Cys	Leu	Gly	Arg	Ser	Tyr	Ala	Val		
210								215							220		
AAC	AGC	ATC	AAA	CAA	TTT	GTG	TTC	CTT	GTG	CTG	GTG	CAC	TTG	GAC	TTG		719
Asn	Ser	Ile	Lys	Gln	Phe	Val	Phe	Leu	Val	Leu	Val	His	Leu	Asp	Leu		
225								230							235		
GAG	CTG	ATC	AAC	GCA	GAT	GTG	GAG	ATC	CCT	GAG	TTT	GAC	CTC	AGC	AGG		767
Glu	Leu	Ile	Asn	Ala	Asp	Val	Glu	Ile	Pro	Glu	Phe	Asp	Leu	Ser	Arg		
240				245					250						255		
TAC	GGC	TTC	GGT	CTG	ATG	CAG	CCG	GAA	CAC	GAC	GTG	CCC	GTC	CGC	TAC		815
Tyr	Gly	Phe	Gly	Leu	Met	Gln	Pro	Glu	His	Asp	Val	Pro	Val	Arg	Tyr		
260								265							270		
CGC	ATC	CGC	CCA	TGACACAGGG	AGCAGATGGA	TCCACGTGCT	CGCCTCTGCC										867
Arg	Ile	Arg	Pro														

275

CAGCCTGCC CAGCCTGCC CAGCCTCCCA GCTTCTGTG TGCACAGTG GCCCGGGTGC 927
 AGGTGCTAGC ATTACCACTT CCCTGCTTT CTCCCAGAAG GCTGGTCCA GGGGAGGGAA 987
 AAGCTAAGAG GGTGAACAAA GAAAAGACAT TGAAAGCTCT ATGGATTATC CACTGCAAAG 1047
 TTTCTTTCC AAAATCAGGC TTTGTCTGCT CCCAATTAC CTCGTTACTC TCACCTCGTG 1107
 ATATCCACAA ATGCTATTCA GATAAGGCAG AACTAGGAGT CTTCACTGCT CTGCCCCCAA 1167
 CTCCCCGGAGG TGTACCTTC CTAGTTCTTA TGAGCTAGCA TGGCCCCGGGC CTTATCCAGT 1227
 CAAAGCGGAT GCTGCCACA GAAAGGCCAC TCAGGATGTC CTTGTGTCC ATCGATGTCG 1287
 ACTCGAGTC 1296

【0141】

配列番号：11

配列の長さ：1977

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

起源

生物名：ヒト

配列の特徴

特徴を表す記号：CDS

存在位置：28..1527

特徴を決定した方法：E

特徴を表す記号：mat peptide

存在位置：28..1527

特徴を決定した方法：S

配列

AGCCCCGCCA GCCCGCCAG CCCCCGCG ATG GCT TGG GCC GCG CTC CTC GGC 51

Met Ala Trp Ala Ala Leu Leu Gly

CTC CTG GCC GCA CTG TTG CTG CTG CTG CTA CTG AGC CGC CGC CGC ACG			99
Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Arg Arg Arg Thr			
10	15	20	
CGG CGA CCT GGT GAG CCT CCC CTG GAC CTG GGC AGC ATC CCC TGG TTG			147
Arg Arg Pro Gly Glu Pro Pro Leu Asp Leu Gly Ser Ile Pro Trp Leu			
25	30	35	40
GGG TAT GCC TTG GAC TTT GGA AAA GAT GCT GCC AGC TTC CTC ACG AGG			195
Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Gly Lys Asp Ala Ala Ser Phe Leu Thr Arg			
45	50	55	
ATG AAG GAG AAG CAC GGT GAC ATC TTT ACT ATA CTG GTT GGG GGC AGG			243
Met Lys Glu Lys His Gly Asp Ile Phe Thr Ile Leu Val Gly Gly Arg			
60	65	70	
TAT GTC ACC GTT CTC CTG GAC CCA CAC TCC TAC GAC GCG GTG GTG TGG			231
Tyr Val Thr Val Leu Leu Asp Pro His Ser Tyr Asp Ala Val Val Trp			
75	80	85	
GAG CCT CGC ACC AGG CTC GAC TTC CAT GCC TAT GCC ATC TTC CTC ATG			339
Glu Pro Arg Thr Arg Leu Asp Phe His Ala Tyr Ala Ile Phe Leu Met			
90	95	100	
GAG AGG ATT TTT GAT GTG CAG CTT CCA CAT TAC AGC CCC AGT GAT GAA			387
Glu Arg Ile Phe Asp Val Gln Leu Pro His Tyr Ser Pro Ser Asp Glu			
105	110	115	120
AAG GCC AGG ATG AAA CTG ACT CTT CTC CAC AGA GAG CTC CAG GCA CTC			435
Lys Ala Arg Met Lys Leu Thr Leu Leu His Arg Glu Leu Gln Ala Leu			
125	130	135	
ACA GAA GCC ATG TAT ACC AAC CTC CAT GCA GTG CTG TTG GGC GAT GCT			483
Thr Glu Ala Met Tyr Thr Asn Leu His Ala Val Leu Leu Gly Asp Ala			
140	145	150	
ACA GAA GCA GGC AGT GGC TGG CAC GAG ATG GGT CTC CTC GAC TTC TCC			531

Thr Glu Ala Gly Ser Gly Trp His Glu Met Gly Leu Leu Asp Phe Ser
 155 160 165
 TAC AGC TTC CTG CTC AGA GCC GGC TAC CTG ACT CTT TAC GGA ATT GAG 579
 Tyr Ser Phe Leu Leu Arg Ala Gly Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Ile Glu
 170 175 180
 GCG CTG CCA CGC ACC CAT GAA AGC CAG GCC CAG GAC CGC GTC CAC TCA 627
 Ala Leu Pro Arg Thr His Glu Ser Gln Ala Gln Asp Arg Val His Ser
 185 190 195 200
 GCT GAT GTC TTC CAC ACC TTT CGC CAG CTC GAC CGG CTG CTC CCC AAA 675
 Ala Asp Val Phe His Thr Phe Arg Gln Leu Asp Arg Leu Leu Pro Lys
 205 210 215
 CTG GCC CGT GGC TCC CTG TCA GTG GGG GAC AAG GAC CAC ATG TGC AGT 723
 Leu Ala Arg Gly Ser Leu Ser Val Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser
 220 225 230
 GTC AAA AGT CGC CTG TGG AAG CTG CTA TCC CCA GCC AGG CTG GCC AGG 771
 Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg
 235 240 245
 CGG GCC CAC CGG AGC AAA TGG CTG GAG AGT TAC CTG CTG CAC CTG GAG 819
 Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu
 250 255 260
 GAG ATG GGT GTG TCA GAG GAG ATG CAG GCA CGG GCC CTG GTG CTG CAG 867
 Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln
 265 270 275 280
 CTG TGG GCC ACA CAG GGG AAT ATG GGT CCC GCT GCC TTC TGG CTC CTG 915
 Leu Trp Ala Thr Gln Gly Asn Met Gly Pro Ala Ala Phe Trp Leu Leu
 285 290 295
 CTC TTC CTT CTC AAG AAT CCT GAA GCC CTG GCT GCT GTC CGC GGA GAG 963
 Leu Phe Leu Leu Lys Asn Pro Glu Ala Leu Ala Ala Val Arg Gly Glu
 300 305 310

CTC GAG AGT ATC CTT TGG CAA GCG GAG CAG CCT GTC TCG CAG ACG ACC	1011		
Leu Glu Ser Ile Leu Trp Gln Ala Glu Gln Pro Val Ser Gln Thr Thr			
315	320	325	
ACT CTC CCA CAG AAG GTT CTA GAC AGC ACA CCT GTG CTT GAT AGC GTG	1059		
Thr Leu Pro Gln Lys Val Leu Asp Ser Thr Pro Val Leu Asp Ser Val			
330	335	340	
CTG AGT GAG AGC CTC AGG CTT ACA GCT GCC CCC TTC ATC ACC CGC GAG	1107		
Leu Ser Glu Ser Leu Arg Leu Thr Ala Ala Pro Phe Ile Thr Arg Glu			
345	350	355	360
GTT GTG GTG GAC CTG GCC ATG CCC ATG GCA GAC GGG AGA GAA TTC AAC	1155		
Val Val Val Asp Leu Ala Met Pro Met Ala Asp Gly Arg Glu Phe Asn			
365	370	375	
CTG CGA CGT GGT GAC CGC CTC CTC TTC CCC TTC CTG AGC CCC CAG	1203		
Leu Arg Arg Gly Asp Arg Leu Leu Leu Phe Pro Phe Leu Ser Pro Gln			
380	385	390	
AGA GAC CCA GAA ATC TAC ACA GAC CCA GAG GTA TTT AAA TAC AAC CGA	1251		
Arg Asp Pro Glu Ile Tyr Thr Asp Pro Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg			
395	400	405	
TTC CTG AAC CCT GAC GGA TCA GAG AAG AAA GAC TTT TAC AAG GAT GGG	1299		
Phe Leu Asn Pro Asp Gly Ser Glu Lys Lys Asp Phe Tyr Lys Asp Gly			
410	415	420	
AAA CGG CTG AAG AAT TAC AAC ATG CCC TGG GGG GCG GGG CAC AAT CAC	1347		
Lys Arg Leu Lys Asn Tyr Asn Met Pro Trp Gly Ala Gly His Asn His			
425	430	435	440
TGC CTG GGG AGG AGT TAT GCG GTC AAC AGC ATC AAA CAA TTT GTG TTC	1395		
Cys Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Val Asn Ser Ile Lys Gln Phe Val Phe			
445	450	455	
CTT GTG CTG GTG CAC TTG GAC TTG GAG CTG ATC AAC GCA GAT GTG GAG	1443		
Leu Val Leu Val His Leu Asp Leu Glu Leu Ile Asn Ala Asp Val Glu			

460	465	470	
ATC CCT GAG TTT GAC CTC AGC AGG TAC GGC TTC GGT CTG ATG CAG CCG			1491
Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg Tyr Gly Phe Gly Leu Met Gln Pro			
475	480	485	
GAA CAC GAC GTG CCC GTC CGC TAC CGC ATC CGC CCA TGACACAGGG			1537
Glu His Asp Val Pro Val Arg Tyr Arg Ile Arg Pro			
490	495	500	
AGCAGATGGA TCCACGTGCT CGCCTCTGCC CAGCCTGCC CAGCCTGCC CAGCCTCCC			1597
GCTTTCTGTG TGCACAGTTG GCCCGGGTGC AGGTGCTAGC ATTACCACTT CCCTGCTTT			
CTCCCAGAAC GCTGGGTCCA GGGGAGGGAA AAGCTAAGAG GGTGAACAAA GAAAAGACAT			1717
TGAAAGCTCT ATGGATTATC CACTGCAAAG TTTCTTTCC AAAATCAGGC TTTGTCTGCT			
CCCAATTACAC CTCGTTACTC TCACCTCGTG ATATCCACAA ATGCTATTCA GATAAGGCAG			1837
AACTAGGAGT CTTCACTGCT CTGCCCCAA CTCCCGGAGG TGTCACCTTC CTAGTTCTTA			
TGAGCTAGCA TGGCCCGGGC CTTATCCAGT CAAAGCGGAT GCTGGCCACA GAAAGGCCAC			1957
TCAGGATGTC CTTTGTGTCC			
1977			

【0142】

配列番号：12

配列の長さ：500

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直線状

配列の種類：ペプチド

配列

Met Ala Trp Ala Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ala Ala Leu Leu Leu

5 10 15

Leu Leu Leu Ser Arg Arg Arg Thr Arg Arg Pro Gly Glu Pro Pro Leu

20 25 30

Asp Leu Gly Ser Ile Pro Trp Leu Gly Tyr Ala Leu Asp Phe Gly Lys

35 40 45

Asp Ala Ala Ser Phe Leu Thr Arg Met Lys Glu Lys His Gly Asp Ile

50	55	60
Phe Thr Ile Leu Val Gly Gly Arg Tyr Val Thr Val Leu Leu Asp Pro		
65	70	75
His Ser Tyr Asp Ala Val Val Trp Glu Pro Arg Thr Arg Leu Asp Phe		
85	90	95
His Ala Tyr Ala Ile Phe Leu Met Glu Arg Ile Phe Asp Val Gln Leu		
100	105	110
Pro His Tyr Ser Pro Ser Asp Glu Lys Ala Arg Met Lys Leu Thr Leu		
115	120	125
Leu His Arg Glu Leu Gln Ala Leu Thr Glu Ala Met Tyr Thr Asn Leu		
130	135	140
His Ala Val Leu Leu Gly Asp Ala Thr Glu Ala Gly Ser Gly Trp His		
145	150	155
Glu Met Gly Leu Leu Asp Phe Ser Tyr Ser Phe Leu Leu Arg Ala Gly		
165	170	175
Tyr Leu Thr Leu Tyr Gly Ile Glu Ala Leu Pro Arg Thr His Glu Ser		
180	185	190
Gln Ala Gln Asp Arg Val His Ser Ala Asp Val Phe His Thr Phe Arg		
195	200	205
Gln Leu Asp Arg Leu Leu Pro Lys Leu Ala Arg Gly Ser Leu Ser Val		
210	215	220
Gly Asp Lys Asp His Met Cys Ser Val Lys Ser Arg Leu Trp Lys Leu		
225	230	235
Leu Ser Pro Ala Arg Leu Ala Arg Arg Ala His Arg Ser Lys Trp Leu		
245	250	255
Glu Ser Tyr Leu Leu His Leu Glu Glu Met Gly Val Ser Glu Glu Met		
260	265	270
Gln Ala Arg Ala Leu Val Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gln Gly Asn Met		
275	280	285

Gly Pro Ala Ala Phe Trp Leu Leu Leu Phe Leu Leu Lys Asn Pro Glu
 290 295 300
 Ala Leu Ala Ala Val Arg Gly Glu Leu Glu Ser Ile Leu Trp Gln Ala
 305 310 315 320
 Glu Gln Pro Val Ser Gln Thr Thr Leu Pro Gln Lys Val Leu Asp
 325 330 335
 Ser Thr Pro Val Leu Asp Ser Val Leu Ser Glu Ser Leu Arg Leu Thr
 340 345 350
 Ala Ala Pro Phe Ile Thr Arg Glu Val Val Val Asp Leu Ala Met Pro
 355 360 365
 Met Ala Asp Gly Arg Glu Phe Asn Leu Arg Arg Gly Asp Arg Leu Leu
 370 375 380
 Leu Phe Pro Phe Leu Ser Pro Gln Arg Asp Pro Glu Ile Tyr Thr Asp
 385 390 395 400
 Pro Glu Val Phe Lys Tyr Asn Arg Phe Leu Asn Pro Asp Gly Ser Glu
 405 410 415
 Lys Lys Asp Phe Tyr Lys Asp Gly Lys Arg Leu Lys Asn Tyr Asn Met
 420 425 430
 Pro Trp Gly Ala Gly His Asn His Cys Leu Gly Arg Ser Tyr Ala Val
 435 440 445
 Asn Ser Ile Lys Gln Phe Val Phe Leu Val Leu Val His Leu Asp Leu
 450 455 460
 Glu Leu Ile Asn Ala Asp Val Glu Ile Pro Glu Phe Asp Leu Ser Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Phe Gly Leu Met Gln Pro Glu His Asp Val Pro Val Arg Tyr
 485 490 495
 Arg Ile Arg Pro
 500

【図面の簡単な説明】**【図1】**

ヒトPGISのcDNAの制限酵素マップ、および λ hPGIS141、pHPGIS135およびpHPGIS36に含有されるPGISのDNAの領域を示す図である。

【図2】

プラスミドpHPGIS36の制限酵素マップを示す図である。

【図3】

プラスミドpHPGIS135の制限酵素マップを示す図である。

【図4】

サイトカインで処理したヒトPGISのmRNAのRNAプロット（電気泳動）分析の結果を示す写真である。

【図5】

PGISのmRNAのヒト体内（脾臓、腎臓、骨格筋、肝臓、肺、胎盤、脳、心臓）における発現分布を電気泳動的に示す写真である。

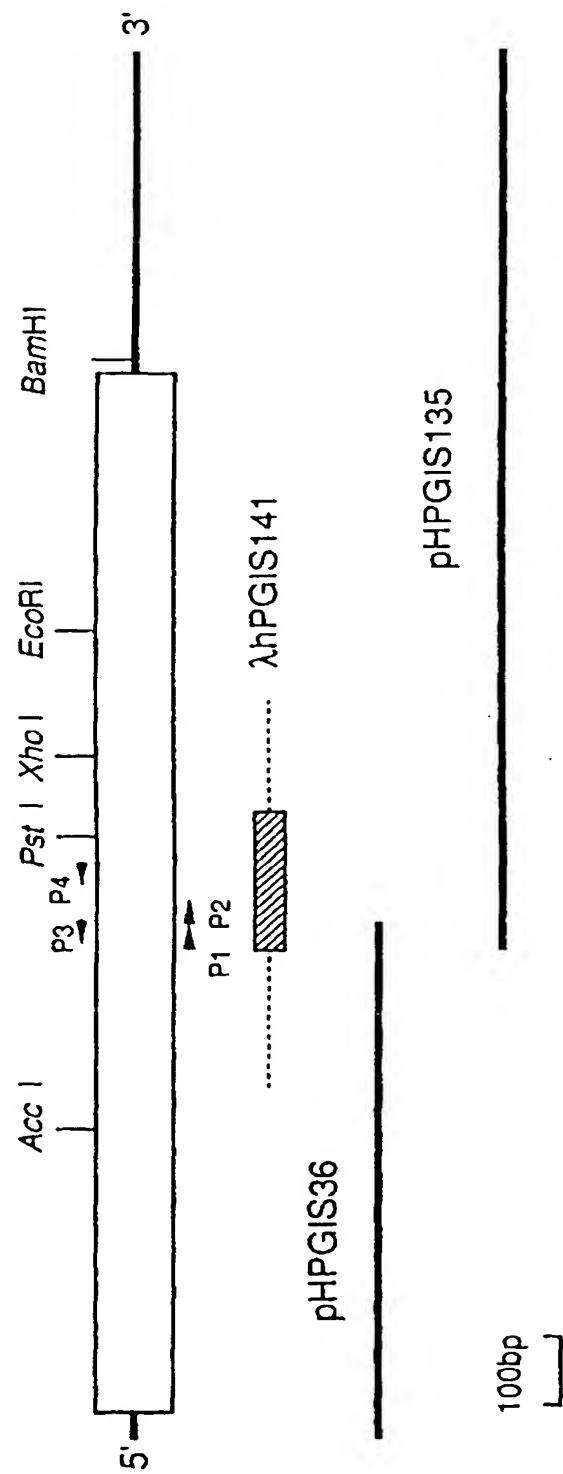
【図6】

PGISのmRNAのヒト体内（周辺白血球、大腸、小腸、卵巣、睾丸、前立腺、胸腺、脾臓）における発現分布を電気泳動的に示す写真である。

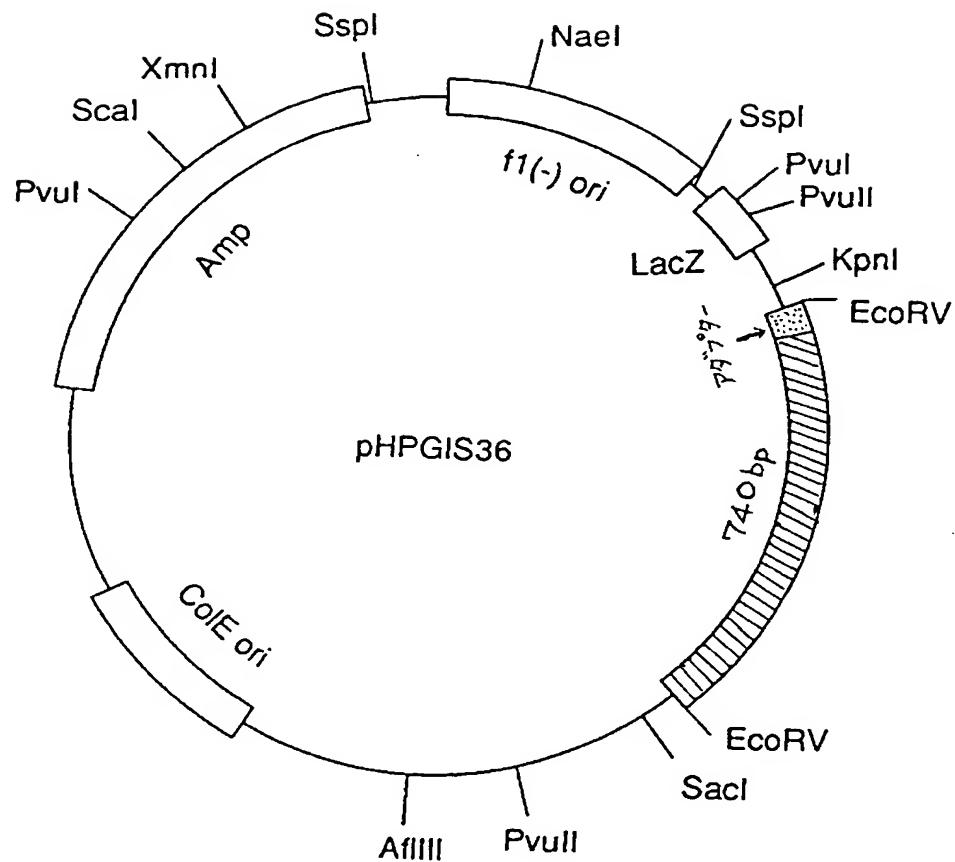
【書類名】

図面

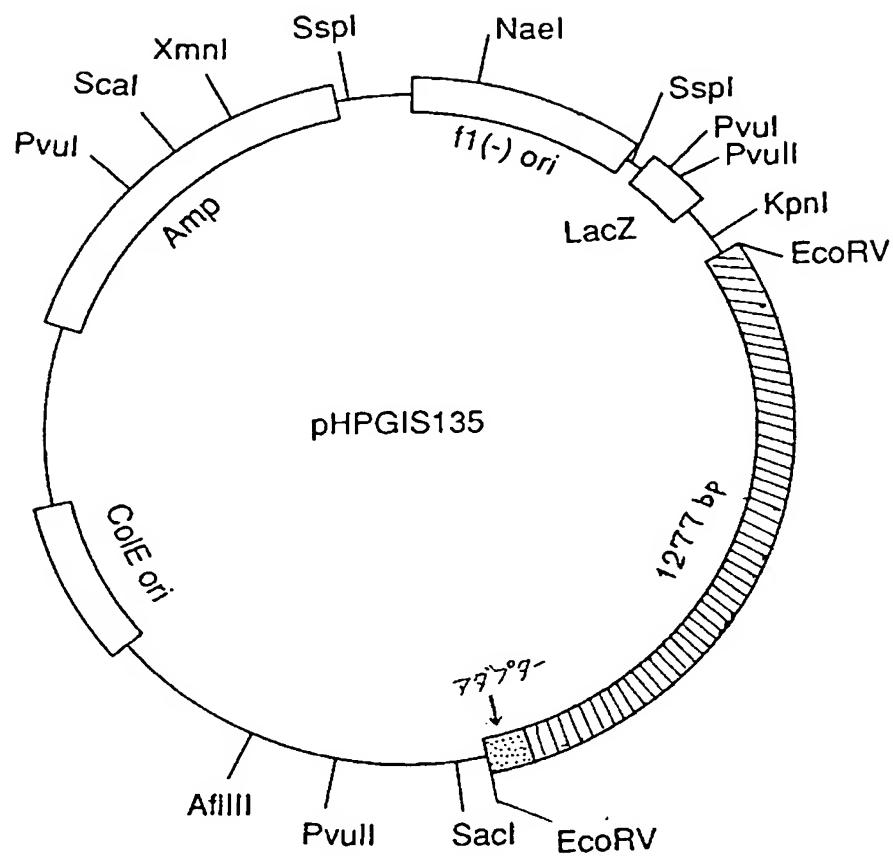
【図1】



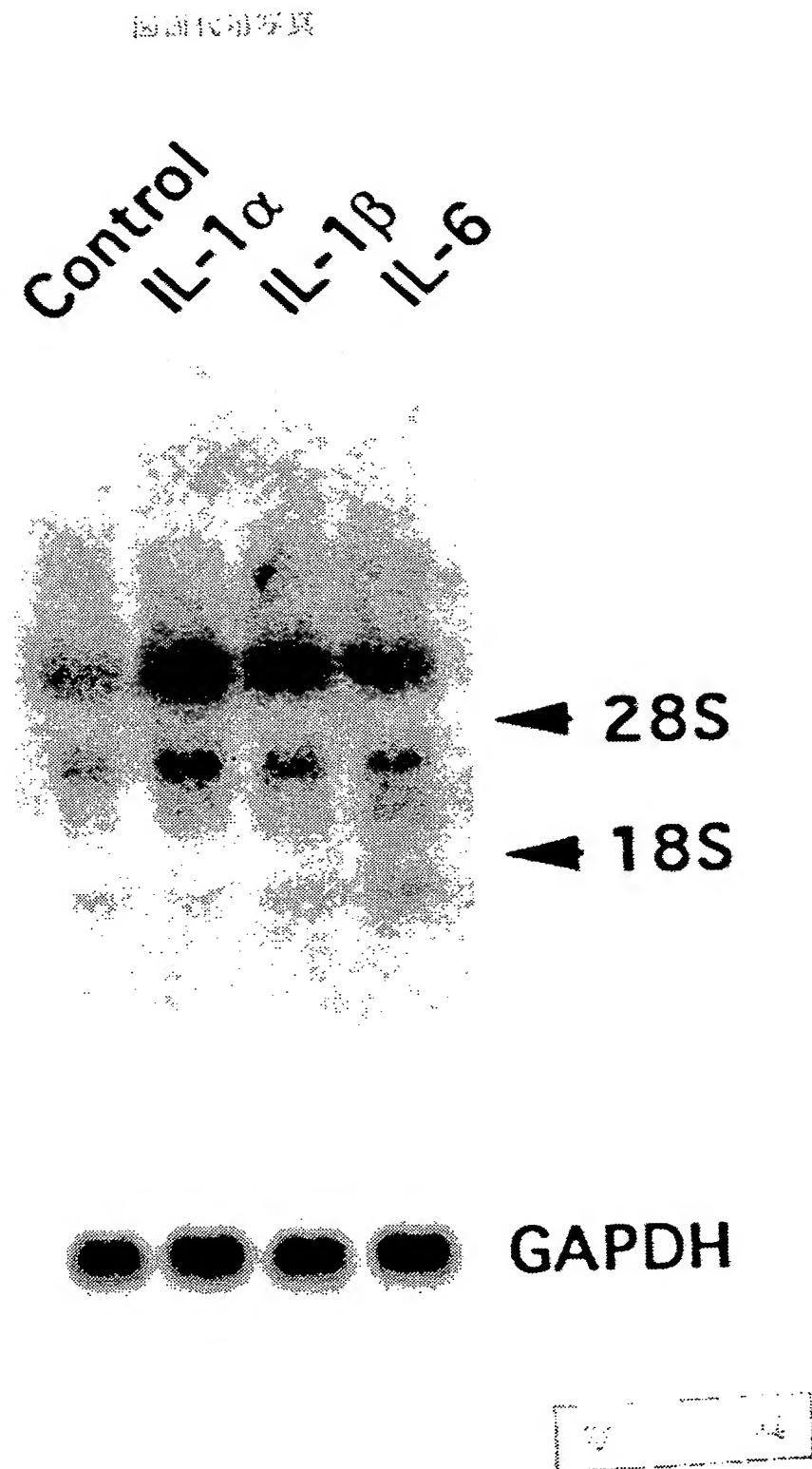
【図2】



【図3】

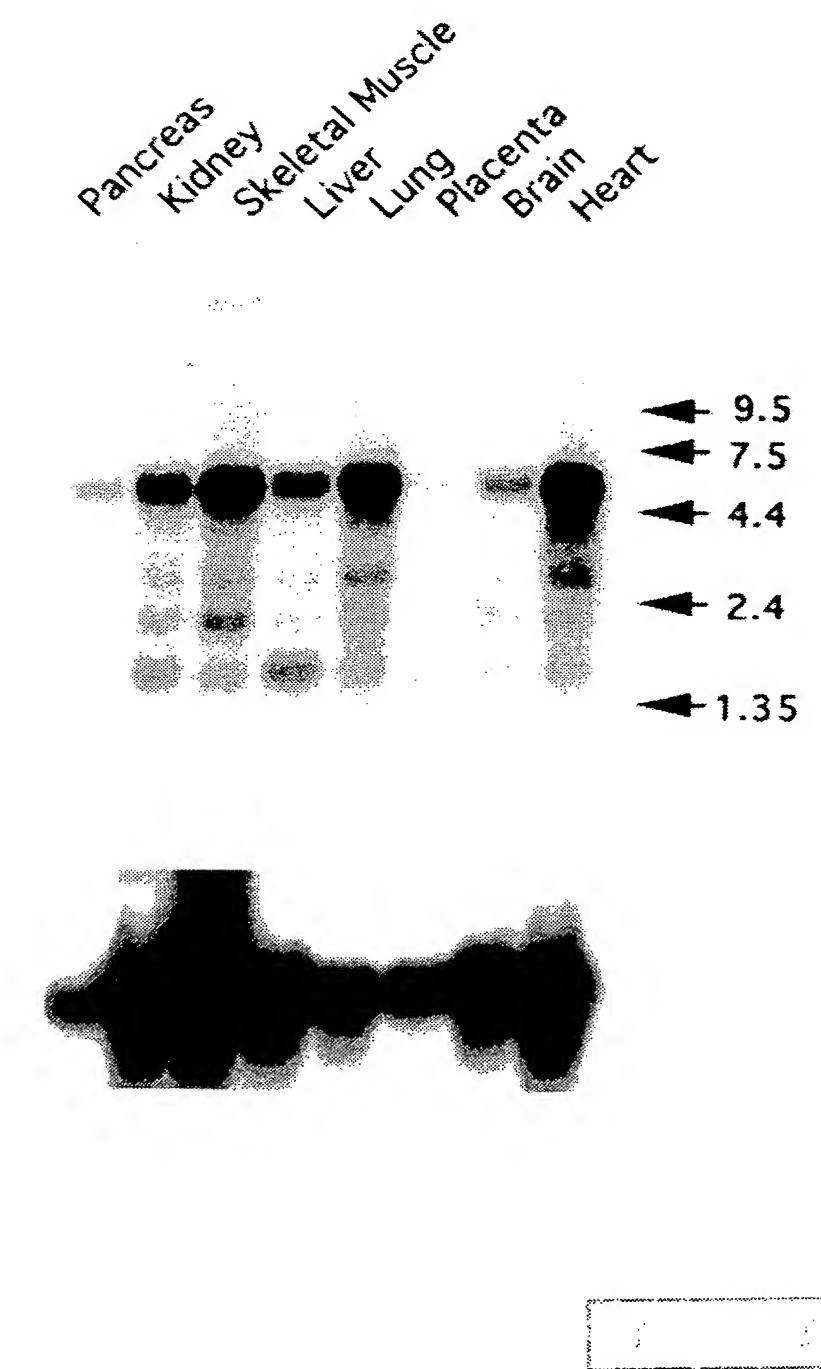


【図4】

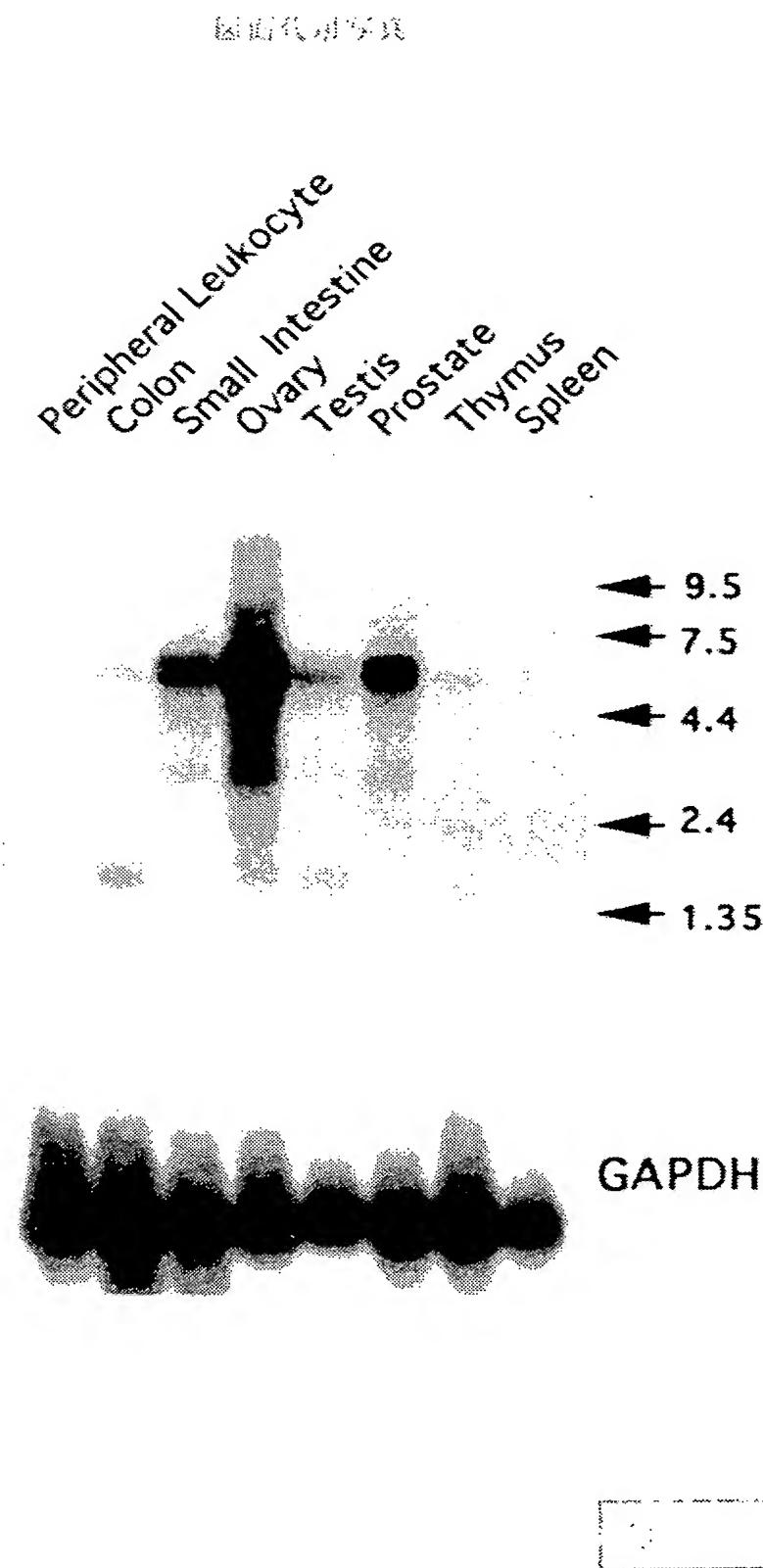


【図5】

回頭代用率表



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【構成】 実質的に配列番号12で示されるヒト由来プロスタサイクリンシンターゼ(PGIS)のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するDNA、該DNAを含有するベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞、該宿主細胞を培地中で培養することによるヒト由来PGISの製造法。実質的に配列番号12で示されるヒト由来PGISのアミノ酸配列を有するポリペプチド、当該ヒト由来PGISに反応性を示す抗体。

【効果】 ヒト由来PGISの一次構造、それをコードする塩基配列を明らかにする。PGIS及びそのDNAは、PGI₂とTXA₂との産生量不均衡による循環器系疾患の治療薬開発のための試薬、PGIS又はそのmRNAの体内組織発現レベルの測定用診断薬として有用。またPGIS等を疾患部位特異的に生体内に導入することによる循環器系疾患の治療薬としての利用。本製造法はヒト由来PGISの簡便、効率的量産に有用。本抗体はヒト由来PGISの精製、免疫組織化学的、病因解析に有用。

【選択図】 なし



国際株式 INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

原寄託についての受託証

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

氏名（名称） 日本たばこ産業株式会社
代表取締役社長 水野 繁 殿
寄託者 あて名 ④ 140
東京都品川区東品川四丁目12番62号

I. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) PRJT-BA-4	(受託番号) FERM BP- 4653
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
III. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 6年 4月 26日（原寄託日）に受領したI欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日（原寄託日）に I 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称： National Institute of Science and Human-Technology Agency of Natural Resources and Energy, Ministry of Economy, Trade and Industry 所長 鈴木 伸一郎 Osamu Suzuki, DIRECTOR GENERAL. あて名： 日本国茨城県つくば市大字山方1丁目1番3号（郵便番号305） 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN	
平成 6年(1994) 4月 26日	



国際様式 INTERNATIONAL FORM

[特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約]

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

原寄託についての受託証

HUNGARIAN TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this
document.

氏名（名称） 日本たばこ産業株式会社

代表取締役社長 水野 繁

寄託者

殿

あて名 ④ 140

東京都品川区東品川四丁目12番62号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
PB JT-BA 5

(受託番号)
FERM BP- 4654

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- 科学的性質
 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 6年 4月 26日(原寄託日)に受領したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は、 年 月 日(原寄託日)に I 欄の微生物を受領した。
そして、 年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名 称： National Institute of Bioscience and Human-Technology
Agency of Natural Resources and Environmental Technology

所 長 岩木 Osamu DIRECTOR GENERAL.

あて名： 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305. JAPAN

平成 6年(1994) 4月 26日

出証特2003-3073974

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000004569

【住所又は居所】 東京都品川区東品川4丁目12番62号

【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区平野町3丁目3番9号 (湯木
ビル) 高島国際特許事務所

【氏名又は名称】 高島 一

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 原寄託についての受託証 2

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成 7年 6月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成 6年特許願第114316号

【発明の名称】 ヒト由来プロスタサイクリンシナーゼ

【承継人】

【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

【氏名又は名称】 田邊 忠

【承継人代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-227-1156

【手数料の表示】

【納付方法】 予納

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 4,400円

【提出物件の目録】

【物件名】 承継人であることを証明する書面 1

【物件名】 委任状 1

譲渡証書

平成7年5月29日

住所 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

譲受人 田邊忠殿

住所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号

譲渡人 日本たばこ産業株式会社

代表者 水野



下記発明に関する特許を受ける権利を貴殿に譲渡したことに相違ありません。

記

1. 出願番号 平成6年特許願第114316号

2. 発明の名称 「ヒト由来プロスタサイクリンシナーゼ」

整理番号

委任状

平成7年5月29日

私は、識別番号 100080791 弁理士 一 氏を以って

代理人として下記事項を委任します。

記

1. 平成6年特許願第114316号
発明の名称 「ヒト由来プロスタサイクリンシナーゼ」
に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更、拒絶査定
不服及び補正却下の決定に対する審判の請求並びに取下げ。
2. 上記出願又は 平成 年 願 号



- に基づく「特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の」優先権主張並び
にその取下げ。
3. 上記出願の分割出願及び補正却下の決定に対する新たな出願に関する一切の件並
びに本件に関する上記事項一切。
4. 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、
証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受けること。
5. 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する
答弁、取下其他本件に関する提出書類及び物件の下附を受けること。
6. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続を為すこと。
7. 上記事項を処理する為、復代理人を選任及び解任すること。
8. 使用に基づく特例の適用の主張の取下げ。

識別番号

住所 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

氏名（名称） 田邊 忠
(代表者)

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 出願人名義変更届

<認定情報・付加情報>

【承継人】

【識別番号】 595110128

【住所又は居所】 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号

【氏名又は名称】 田邊 忠

【代理人】

【識別番号】 100080791

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区平野町3丁目3番9号 (湯木
ビル) 高島国際特許事務所

【氏名又は名称】 高島 一

【提出された物件の記事】

【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

承継人であることを証明する書面 1

特願平06-114316

出願人履歴情報

識別番号 [00004569]

1. 変更年月日 1991年 7月 1日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都品川区東品川4丁目12番62号
氏 名 日本たばこ産業株式会社
2. 変更年月日 1995年 5月 16日
[変更理由] 住所変更
住 所 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
氏 名 日本たばこ産業株式会社

特願平06-114316

出願人履歴情報

識別番号 [595110128]

1. 変更年月日 1995年 6月26日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府豊中市東豊中町3丁目18番13号
氏名 田邊 忠